



Avaliação da Qualidade de Sementes de Farinha-Seca (*Albizia hasslerii*) pelo Teste de Tetrázólio

Evaluation of the Quality of Farinha-Seca Seeds (Albizia hasslerii) by the Tetrazolium Test

DUBOC, Eny¹; SILVEIRA, Maria Carolina Arruda²; NASCENTES, Taynara Faria³

¹Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, eny.duboc@embrapa.br; ²Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, mcasilveira19@gmail.com; ³Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, MG, taynaranascentes17@gmail.com

Resumo: Métodos mais baratos de recuperação da vegetação arbórea nativa em áreas degradadas, como a semeadura direta no campo, necessitam superar algumas barreiras como a elevada quantidade de sementes requeridas e, também, a diferença entre os percentuais de germinação obtidos em campo e laboratório. Neste sentido, a aplicação de testes mais rápidos do que os tradicionais de germinação, podem auxiliar na determinação da qualidade das sementes. Nesse estudo, avaliou-se qualidade de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii*) pelo teste de tetrázólio, comparando com a germinação obtida em laboratório e no viveiro. Foram realizados testes de germinação em câmara de crescimento BOD (Biochemical Oxygen Demand), em sementeira em casa de vegetação, e teste com 2,3,5 trifênil cloreto de tetrázólio em duas concentrações (0,3% e 0,5%). Os resultados alcançados indicaram que o percentual de sementes viáveis, obtido em sementes escarificadas em ácido sulfúrico por três minutos, antes da embebição por 24 horas para retirada do tegumento, e imersas em solução de tetrázólio na concentração de 0,5% por duas horas, é semelhante ao percentual de germinação obtido em BOD e em casa de vegetação.

Palavras-chave: Germinação, Vigor, Semeadura Direta.

Abstract: Lower-cost methods of recovering native tree vegetation in degraded areas, such as direct seeding in the field, need to overcome some barriers such as the high amount of seeds required, and the difference between the percentage of germination obtained in the field and the laboratory. In this sense, the application of faster tests, than the traditional ones of germination, can help in the determination of the quality of the seeds. In this study, the quality of farinha-seca seeds (*Albizia hasslerii*) was evaluated by the tetrazolium test comparing with the germination obtained in the laboratory and in the nursery. Germination tests were carried out in a BOD (Biochemical Oxygen Demand) growing chamber, under greenhouse sowing, and tested with 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride in two concentrations (0.3% and 0.5%). The results showed that the percentage of viable seeds obtained in seeds scarified in sulfuric acid for 3 minutes, before soaking for 24 hours for tegument removal, and immersed in 0.5% tetrazolium solution for 2 hours, is similar to the percentage of germination obtained in BOD and in greenhouse

Keywords: Germination, Vigor, Direct Sowing.



Introdução

A espécie arbórea *Albizia hasslerii*, conhecida como farinha-seca, apesar de não possuir madeira com valor comercial (geralmente usada para caixotaria), é muito ornamental, sendo empregada no paisagismo (LORENZI, 2002). Também é recomendada para plantios protetivos mistos, e pode ser encontrada na vegetação nativa, em Florestas Estacionais Deciduais, nas Semideciduais, no Cerradão, no Pantanal, e no Mato Grosso do Sul em ambientes fluviais ou ripários (CARVALHO, 2008). A farinha-seca, árvore de grande porte, atinge até 35 m de altura, com 80 cm de DAP (diâmetro a altura do peito) e fuste de até 12 m. É espécie heliófila, classificada como; pioneira (POTT; POTT, 1994), secundária inicial (NAVE et al., 1997) ou secundária tardia (FERRETTI et al., 1995), sendo frequentemente encontrada em pastos; por esse motivo e pelo seu sistema radicular apresentar nódulos de fixação de nitrogênio, pode ser espécie interessante para o uso em sistemas agroflorestais na arborização de pastagens (CARVALHO, 2008).

A farinha-seca apresenta sementes longevas, que suportam armazenamento em câmara fria por mais de um ano (DURIGAN et al., 1997), no entanto, possuem dormência tegumentar, necessitando de escarificação para germinar (FLORIANO, 2004; FOWLER et al., 2006). Face a busca do desenvolvimento de técnicas de revegetação mais baratas, como por exemplo a semeadura direta no campo, em comparação ao plantio convencional por mudas de espécies arbóreas, a determinação da qualidade e da germinabilidade das sementes é muito importante.

Nesse sentido, na determinação da vitalidade das sementes, o teste de tetrazólio apresenta muitas vantagens em relação ao teste padrão de germinação, pois além de ser rápido, pode contornar problemas como o aparecimento de fungos, a presença de sementes duras, e o longo período de germinação de algumas espécies, em especial daquelas que possuem dormência, cujo teste de germinação pode levar semanas ou até meses para se completar (MARCOS FILHO et al., 1987).

O teste de tetrazólio estima a viabilidade das sementes, com base na alteração da coloração de tecidos vivos em presença de uma solução com o sal. Essa alteração na coloração reflete a atividade de sistemas enzimáticos específicos, em especial as enzimas desidrogenases, envolvidas na atividade respiratória, e intimamente relacionadas com a viabilidade das sementes. O sal de tetrazólio dissolvido é incolor, e quando posto em contato com os tecidos vivos das sementes, reage com os íons de hidrogênio (H^+) produzindo o composto de cor vermelha e insolúvel, trifênilformazan. É essa substância que dá a coloração róseo-avermelhada aos tecidos vivos da semente. Como o pigmento formado não se difunde, o tecido que respira (vivo) apresenta nítida delimitação do tecido, descolorido, que não respira (morto). Por outro lado, tecidos deteriorados, que apresentam células das paredes rompidas, liberando substâncias e íons de hidrogênio, reagem fortemente,



adquirindo coloração vermelha intensa (PIÑA-RODRIGUES e VALENTINI, 1995; MARCOS FILHO et al., 1987).

Para a condução do teste, a escolha da concentração da solução de tetrazólio e do tempo de incubação das sementes, depende da espécie avaliada, do método de pré-condicionamento, e da permeabilidade do tegumento (MARCOS FILHO et al., 1987), além da facilidade em evidenciar as sementes viáveis e inviáveis (KRZYŻANOWSKI et al., 1999).

Para permitir o contato do tetrazólio com os tecidos da semente faz-se necessário um pré-condicionamento, e os métodos mais comuns são; a punção, o corte e a retirada do tegumento (PIÑA-RODRIGUES e VALENTINI, 1995). Apesar da remoção do tegumento, em geral, possibilitar maior uniformidade e rapidez no desenvolvimento da coloração, do que os outros métodos pode ser uma operação trabalhosa e demorada, e ainda causar danos às estruturas da semente, alterando os resultados (ZUCARELI et al., 2001). No intuito de facilitar essa operação, procede-se a embebição prévia das sementes, que além de amolecer o tegumento, promove a ativação do sistema enzimático, facilitando a penetração da solução, e permitindo uma coloração mais nítida.

Apesar de existirem trabalhos de padronização do teste de tetrazólio para algumas espécies florestais, as técnicas ainda não estão completamente estabelecidas. Para *Albizia hasslerii*, é recomendado o pré-condicionamento com escarificação manual, seguida de embebição em água a 25°C, por 24 horas, e como modo de preparo, a retirada do tegumento com corte longitudinal através do centro do eixo embrionário (ZORZAL et al., 2015; ZUCARELI et al., 2001).

Contudo, Zucareli et al. (2001), relatam que as sementes pré-condicionadas com o corte longitudinal, apesar de uniformemente coloridas, apresentam danos no local do corte, exibindo coloração vermelha-intensa, característica de acentuada atividade respiratória (processo de deterioração). Os autores relataram também, que o pré-condicionamento por escarificação mecânica, antes da embebição em água, apesar de proporcionar coloração róseo-intensa e uniforme, pode apresentar resultados variáveis, de acordo com, os danos causados pelo processo de escarificação, além de ser trabalhoso e demandar excessivo número de horas de trabalho.

Atualmente, para recuperação da vegetação arbórea nativa em áreas degradadas, a semeadura direta tem sido testada como um método mais barato, em comparação ao plantio convencional por mudas (PELLIZZARO et al., 2017; ISERNHAGEN, 2010; FERREIRA et al., 2009). Entretanto, entre as dificuldades de aplicação desta técnica estão o grande número de espécies usadas no reflorestamento, a elevada quantidade de sementes requeridas, bem como, a diferença entre os percentuais de germinação obtidos em campo e laboratório.



Considerando o tempo que os testes convencionais de germinação levam para se completar, especialmente no caso de sementes com dormência, a aplicação de testes mais rápidos, pode facilitar e agilizar a determinação da qualidade das sementes. Esse trabalho teve como objetivos, estabelecer classes de coloração no teste de tetrazólio, para qualificar as sementes de farinha-seca como viáveis e inviáveis, e avaliar a qualidade, comparando com testes de germinação.

Metodologia

Os experimentos foram conduzidos entre setembro e novembro de 2017, na Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, Mato Grosso do Sul, no Laboratório de Sementes Florestais e em casa de vegetação. As sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii*), adquiridas junto a empresa BENTEC, de Santa Catarina, safra de 2015, permaneceram sob refrigeração entre 8 a 10°C, em sacos plásticos, até o momento da realização dos testes.

O teste de germinação em laboratório foi conduzido em caixas gerbox sobre papel filtro, com quatro repetições de 25 sementes, em câmara BOD (Biochemical Oxygen Demand), sob temperatura constante de 30°C e fotoperíodo alternado de 12 horas. O teste de germinação, conduzido em sementeiras em casa de vegetação, contou com quatro repetições de 25 sementes, em delineamento inteiramente ao acaso. Para os dois testes realizou-se a superação da dormência com imersão das sementes em ácido sulfúrico (H₂SO₄) durante três minutos, seguido de lavagem em água corrente (FLORIANO, 2004; FOWLER et al., 2006).

A germinação na BOD e na sementeira foram avaliadas duas vezes por semana, durante 30 dias. Na BOD adotou-se o critério botânico no qual são consideradas germinadas as sementes em que houve a protrusão da radícula. O percentual de germinação (%G) foi obtido pela fórmula $\%G = (Ni) / (Ns) \times 100$ onde; Ni = número de sementes germinadas, Ns = número de sementes semeadas. Tendo em vista o resultado ser expresso em percentagem, houve necessidade de transformação de dados, utilizando-se $\sqrt{(y+0,5)}$.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado pelo método proposto por Maguire (1962), utilizando-se a seguinte fórmula: $IVG = E1 / N1 + E2 / N2 + \dots + En / Nn$ sendo; E1, E2..., En = número de sementes computadas na primeira, segunda e na última contagem e, N1, N2..., Nn = número de dias da semeadura até primeira, segunda e até a última contagem.

Para aplicação do teste de tetrazólio em sementes de farinha-seca, é recomendado o pré-condicionamento para a retirada do tegumento, pela imersão das sementes em água por 24 horas, a 25°C, ou o lixamento das sementes antes deste molho (ZUCARELI et al., 2001). Entretanto, após esses procedimentos, verificou-se a não



embebição das sementes, ou embebição desuniforme, dificultando a retirada do tegumento e causando danos à semente durante essa operação.

Deste modo, as sementes utilizadas para o teste de tetrazólio foram tratadas de modo semelhante àquelas que foram destinadas aos testes na BOD e na sementeira, ou seja, foram imersas em ácido sulfúrico puro por três minutos, para escarificar o tegumento e possibilitar embebição. Após lavagem para retirada do ácido, as sementes permaneceram no molho em água destilada, por 24 horas, a 25°C em BOD, procedendo-se em seguida a remoção manual do tegumento.

Após a retirada do tegumento, quatro repetições de 25 sementes foram imersas na solução de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio em duas concentrações (0,3% e 0,5%), permanecendo no escuro por duas horas, na temperatura de 30°C em BOD. As sementes foram agrupadas conforme a coloração e o tipo de dano apresentado, e classificadas em viáveis e inviáveis, levando em consideração a estrutura morfológica da semente (Figura 1). A viabilidade foi calculada pela fórmula $%V = (Nv / Nt) \times 100$, onde Nv = número de sementes viáveis e Nt = número de sementes totais. Os resultados, por serem obtidos em porcentagem, foram transformados por $\sqrt{(y+0,5)}$. Para a análise de variância utilizou-se o programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2000). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

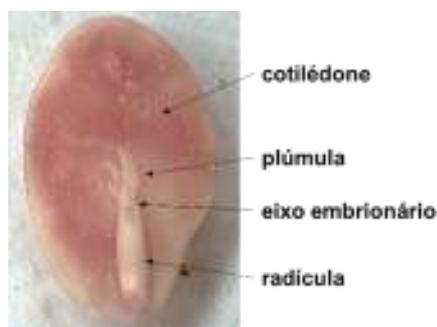


Figura 1. Semente de farinha-seca (*Albizia hasslerii*), colorida pela solução de 2,3,5 trifênil tetrazólio, evidenciando as estruturas morfológicas. Dourados, MS, 2017.

Resultados e discussão

Os resultados dos testes de germinação e do tetrazólio, mostrados na Tabela 1, indicam sementes com maior viabilidade, na concentração de 0,3%, diferindo da germinação na sementeira. Enquanto que, a viabilidade determinada na concentração 0,5%, não diferiu da porcentagem de germinação obtida na BOD e na sementeira, sugerindo ser a melhor concentração para determinação rápida da viabilidade das sementes de farinha-seca.



Tabela 1. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii*), percentual de germinação (%G) em câmara de germinação (BOD), e em sementeira em casa de vegetação, e percentual de viabilidade (%V) expresso pelo teste de tetrazólio (TZ) em duas concentrações. Dourados, MS, 2017.

Tratamento	%G ou %V ^{1, 2}	IVG ^{NS}
TZ (0,3%)	67,49 a	-
TZ (0,5%)	56,80 ab	-
BOD	57,92 ab	3,8334
Sementeira	54,64 b	4,5602
Média	58,87	4,1968
CV %	7,64	22,43

(¹) Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância, (^{NS}) não significativo. (²) Dados transformados calculados.

Embora, o teste do tetrazólio seja relativamente simples, requer a aplicação de critérios subjetivos, baseados em padrões de coloração, por este motivo é importante a realização paralela de testes de germinação (PIÑA-RODRIGUES e VALENTINI, 1995). Cada semente deve ser analisada individualmente (interior e exterior), observando a localização e extensão dos danos. A coloração é apenas um dos fatores a ser analisado, a localização das manchas, a turgescência dos tecidos, e a presença de fraturas ou lesões em regiões vitais da semente, também devem ser observadas durante a interpretação (BHÉRING et al., 1996; PIÑA-RODRIGUES e VALENTINI, 1995; MARCOS FILHO et al., 1987).

As sementes de farinha-seca classificadas como viáveis, pelo teste do tetrazólio, podem ser vistas na Figura 2, e os diferentes tipos de danos das sementes consideradas inviáveis, na Figura 3. Considerando, a coloração rósea brilhante uniforme, como típica de tecido sadio, a coloração creme amarelada como típica de tecido morto, e a coloração vermelha intensa, como a de tecidos em deterioração.

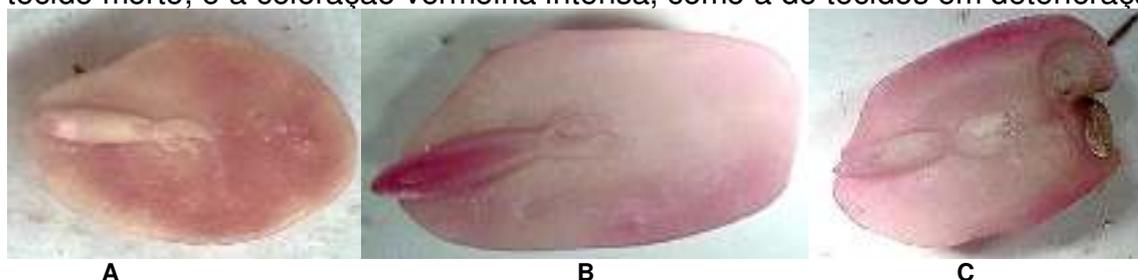


Figura 2. Classes de sementes viáveis de farinha-seca (*Albizia hasslerii*), evidenciadas pela solução de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio a 0,5%: A) coloração rósea uniforme e todos os tecidos com aspecto normal e firme, B) coloração rósea uniforme e radícula apresentando



coloração rósea mais acentuada, C) coloração rósea uniforme e menos de 50% da região cotiledonar vermelha intensa ou com danos. Dourados, MS, 2017.

A escarificação das sementes de farinha-seca em ácido sulfúrico, antes do pré-condicionamento em água destilada, facilitou a embebição e a retirada manual do tegumento. O ácido não causou danos às sementes, e permitiu coloração uniforme, possibilitando a diferenciação em sementes viáveis e inviáveis, após imersão em solução de tetrazólio.

A imersão das sementes de farinha-seca, na solução de tetrazólio a 0,5%, por duas horas, no escuro, e a 30°C em BOD, evidenciou percentual de viabilidade semelhante ao percentual de germinação obtido em BOD e em casa de vegetação.

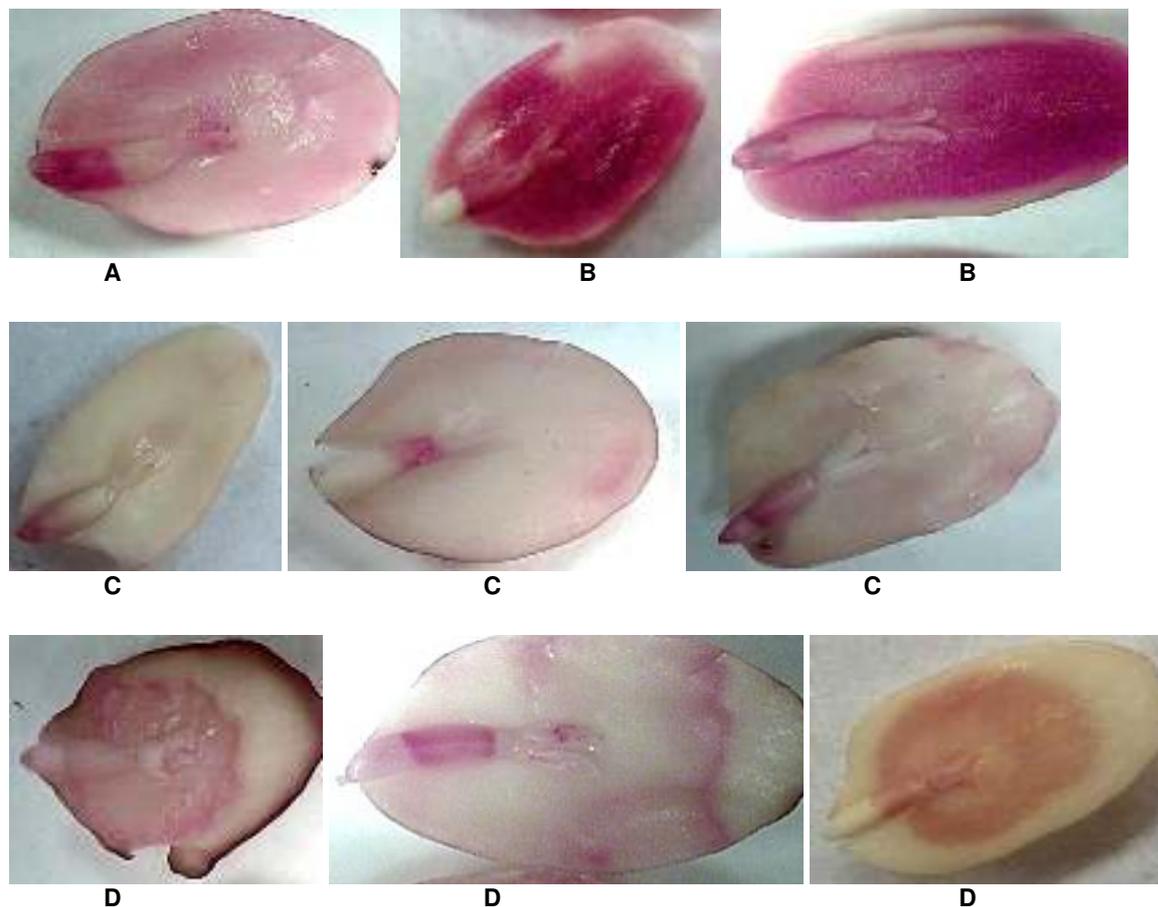


Figura 3. Classes de sementes inviáveis de farinha-seca (*Albizia hasslerii*), evidenciadas pela solução de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio a 5%: A) coloração rósea uniforme e eixo embrionário, ou parte deste, com coloração vermelha intensa, B) totalmente com coloração vermelha intensa, indicando processo acentuado de deterioração, C) pequena região do eixo embrionário com coloração vermelha intensa e região cotiledonar com coloração creme e leitosa, caracterizando tecido morto e, D) eixo embrionário e mais de 50% da região



cotiledonar apresentando manchas creme e leitosas ou vermelha intensa dispersas. Dourados, MS, 2017.

Conclusões

Para avaliação rápida da qualidade de sementes de farinha-seca, o teste de tetrazólio pode substituir o teste de germinação em BOD, ou em casa de vegetação.

O pré-condicionamento, para aplicação do teste de tetrazólio, com escarificação por três minutos em ácido sulfúrico, seguido de embebição por 24 horas, facilita a retirada manual do tegumento, e não causa danos às sementes.

A imersão das sementes de farinha-seca, em solução de 0,5% de tetrazólio por duas horas, possibilitou coloração uniforme e obtenção de resultados de viabilidade semelhante ao percentual de germinação obtido em BOD e em casa de vegetação.

Referências bibliográficas

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M. B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M. A. de O.; BAITELLO, J. B. **Sementes e mudas de árvores tropicais**. São Paulo: Páginas & Letras, 1997.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000.

FERREIRA, R. A.; SANTOS, P. L.; ARAGÃO, A. G. de; SANTOS, T. I. S.; SANTOS NETO, E. M. dos; REZENDE, A. M. da S. Semeadura direta com espécies florestais na implantação de mata ciliar no Baixo São Francisco em Sergipe. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 37-46, 2009.

FERRETTI, A. R.; KAGEYAMA, P. Y.; ÁRBOCZ, G. de F.; SANTOS, J. D. dos; BARROS, M. I. A. de; LORZA, R. F.; OLIVEIRA, C. de. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas do Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 3, n. 7, p. 73-84, 1995.

FOWLER, J. A. P.; CARPANEZZI, A. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Tecnologia para o manejo adequado de sementes de farinha-seca. **Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo**, n. 53, p. 195-208, jul./dez. 2006. Disponível em: <<http://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/211>>. Acessado em: 10 ago. 2017.



ISERNHAGEN, I. **Uso da semeadura direta de espécies arbóreas nativas para restauração florestal de áreas agrícolas, sudeste do Brasil.** 2010. 105f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes.** Londrina: ABRATES. 1999. 218p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1, 368 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination- aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade de sementes.** Piracicaba: FEALQ, 1987. 230 p.

NAVE, A. G.; RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S. Planejamento e recuperação ambiental da Fazenda São Pedro da Mata, Município de Riolândia, SP. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3., 1997, Ouro Preto. **Do substrato ao solo: trabalhos voluntários.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1997.

PELLIZZARO, K. F.; CORDEIRO, A. O. O.; ALVES, M.; MOTTA, C. P.; REZENDE, G. M.; SILVA, R. R. P.; RIBEIRO, J. F.; SAMPAIO, A. B.; VIEIRA, D. L. M.; SCHIMIDT, I. B. "Cerrado" Restoration by direct seeding: field establishment and initial growth of 75 shrubs and grass species. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo. v. 40, n. 3, p. 681-693, 2017.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; VALENTINI, S. R. T. Aplicação do teste de tetrazólio. In: Manual técnico de sementes florestais. **Instituto Florestal**, São Paulo, n. 14, p. 61-73, 1995. (Série Registros).

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal.** Corumbá: EMBRAPA CPAP; Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. 320 p.

ZORZAL, T. A.; FANTINATO, D. E.; CAMPOS, L. M.; LUZ, A. C. C. da; CORTE, V. B. Teste do tetrazólio para estimativa da viabilidade de sementes. **Natureza on line**, Santa Teresa, v. 13, n. 3, p. 144-149, 2015.

ZUCARELI, C.; MALAVASI, M. M.; FOGAÇA, C. A.; MALAVASI, U. C. Preparo e coloração de sementes de farinha-seca (*Albizia hasslerii* (Chodat) Burr.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 186-191, 2001.